

Title	Usefulness of Self Ligation Mediated Polymerase Chain Reaction : A Rapid Method for Fingerprinting in Molecular Epidemiology of tuberculosis
Author(s)	Ruhul, Amin
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/42641
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について こちら をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名	るふる Ruhul	あみん Amin
博士の専攻分野の名称	博 士 (医 学)	
学 位 記 番 号	第 1 6 1 2 0 号	
学 位 授 与 年 月 日	平成13年 3 月 23 日	
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第4条第1項該当 医学系研究科外科系専攻	
学 位 論 文 名	Usefulness of Self Ligation Mediated Polymerase Chain Reaction : A Rapid Method for Fingerprinting in Molecular Epidemiology of tuberculosis (Self Ligation Mediated Polymerase Chain Reaction の開発とその有用性：結核の分子疫学における菌株の DNA 指紋の迅速識別法)	
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 白 倉 良 太 (副査) 教 授 山 西 弘 一 教 授 本 田 武 司	

論 文 内 容 の 要 旨

【目的】

結核菌株種の分子生物学の進歩により結核疫学研究が大幅に進歩してきている。中でも IS6110 を用いた RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 分析は結核菌の疫学研究に広く使われている。挿入配列 IS6110 は IS 3 群に属する配列であり、結核菌種のすべてにみられる。臨床的には無関係な菌株の間には非常に多い IS6110 RFLP パターンが存在している。一方、疫学的に関連している株の間には同一の、類似したパターンがみられる。RFLP 法を用いた型識別には多くの手技段階を含み手間と時間がかかるという大きな欠点がある。

そこで、PCR 手法を用いても IS6110 のある部位を増幅させて多形成を同定できる可能性があることから、PCR 手技を応用した SL-PCR (self-ligation mediated PCR) を利用し、RFLP 法の欠点を克服できる方法を開発した。この方法は、IS6110 の内側から外側に向けて配列した一対のプライマーを使ったものである。IS6110 の配列を持つ DNA 部分を *Sau3* AI を使って分解し、PCR 手法を用いて増幅し、結核菌株の染色体 DNA と結合させることによる方法である。この方法を用いることにより、これまでの結核菌の型識別にかかっていた 1 か月以上の期間を 8 時間以内に短縮することができる。

【方法】

プライマーとして使われるオリゴヌクレオチドは、TBIS6110-*Sau* I、TBIS6110-*Sau*2、TBIS6110-*Sau*NI and TBIS6110-*Sau*N 2 であり、これらは IS6110 element の中に配置されている塩基配列である。SL-PCR は、染色体 DNA (50ng/μl) に *Sau3* AI を加えて 37°C、2 時間消化し、その後 65°C、20 分加熱し酵素を失活させる。分解した断片は、最初の PCR によって同じ量の ligation solution I を混ぜて 16°C、2 時間で結合させる。

はじめの PCR 反応溶液には (50 μl)、PCR、2.5mM MgCl₂、200mM の each dATP、dCTP、dGTP、dTTP、ligated TB DNA、1.25units of Takara *Taq* DNA polymerase and 2 uM each primer TBIS6110-*Sau*NI and TBIS6110-*Sau*N 2 を入れる。プライマーは Thermal cycler personal で 35 回繰り返す。各々のサイクルの後、94°C 30 秒で不活化し、55°C 30 秒に戻し、そして 72°C 1 分で伸展させる。第 2 の PCR は最初の PCR 1 μl を鋳型としてつくる。PCR の条件は、プライマーとして、TBIS6110-*Sau* I、TBIS6110-*Sau* 2 を使うこと以外は、最初の PCR と同じである。

PCR は、TG buffer (25mM Tris-base、192mM glycine、pH8.4) を用いた 20mA 2 時間の polyacralamide gel で

電気泳動（15～250%Multigel）を行い、その後に SYBR の green staining を行う。

【結果】

IS6110配列部を増幅させる SL-PCR（self-ligation mediated PCR）と言われる PCR 逆法を使った。染色体 DNA は制限酵素 *Sau 3 A I* で消化してから結合させる。自己結合した反応物は PCR による増幅の鋳型として使う。このプライマーは制限酵素 *Sau 3 A I* で消化した150bp の IS6110断片である。本研究では、結核患者からの臨床の場で分離された15株と、集団発生時に分離した21株のあわせて34の分離株を用いて、SL-PCR による結核菌 DNA 指紋型分析方法の有用性を、同じ PCR 法である ML-PCR、これまでの結核菌 DNA 指紋型分析方法として定着している RFLP 法の3つの分析結果を比較することによって SL-PCR の有用性を評価した。

臨床上分離された21株の独立株に対して SL-PCR 法と、ML-PCR 法および RFLP 法の各分析を行った。SL-PCR 法では結核菌に最大15バンドまで識別できる。一方 RFLP 法と ML-PCR 法では20～30までのバンドを確認することができる。SL-PCR 法による増幅された DNA 断端の分子量は50～400bp、ML-PCR 法の生成物の分子量は100～1400bp である。

ついで、5つの集団発生確認のために収集した13の菌株を3つの方法で識別分析を行った。5ケース中の4ケースはこれらの3方法の間には強い相関関係がみられた。しかし、最も強い相同性は SL-PCR 法と RFLP 分析の間にみられた。この結果から、同じ PCR 法の中でも、SL-PCR 法の方が ML-PCR よりもすぐれていることが示された。

これまで幅広く使われている RFLP 分析と比べて、PCR 法である SL-PCR と ML-PCR が特にすぐれている点は結核菌の培養の作業が不要であることにある。その結果、分離株培養の4週間は必要なくなる。また、SL-PCR 法や ML-PCR 法ともに指紋型分析には極少量の菌だけで実施できる利点がある。SL-PCR 法と ML-PCR 法の比較では、SL-PCR 法は簡便性にすぐれている。

【総括】

本研究の結果、これまで結核菌株の型分類に IS6110を使った RFLP 法が普及してきているが、この方法のもつ手間と時間がかかる欠点は PCR 法を用いた SL-PCR 法で克服できることが示された。SL-PCR 法は RFLP 分析に比べて技術的に簡単であり、また再現性が高く、迅速、かつ極少量の DNA で実施できる利点がある。この利点は集団発生の監視や患者間の関連の分析や、結核の蔓延状況をモニタリングしていく上で利点が多いことを示すものである。しかし、RFLP 法で識別できる多くの菌株に対しては SL-PCR 法による識別も特異的であるが1ないし2バンドしか形成しない菌株については RFLP 法と同様に SL-PCR 法でも信頼できる分類はできない欠点が残されている。

論文審査の結果の要旨

結核菌株種の分子生物学の進歩により結核の疫学研究が大幅に進歩してきている。中でも IS 3 群に属する挿入配列 IS6110をプローブとした RFLP（restriction fragment length polymorphism）分析は結核菌の疫学研究に広く使われている。感染経路が異なる患者から検出される菌種の間には IS6110の非常に強い多形性が認められ、RFLP 法を用いた型識別により精度の高い疫学調査が可能になっている。しかし、RFLP 法には大量の DNA を要し、手技の煩雑性から手間と時間がかかるという大きな欠点がある。

そこで、PCR 法を用い IS6110のある部位を増幅させることにより多形性を同定できる可能性があると考え、SL-PCR（self-ligation mediated PCR）法を利用し、RFLP 法の欠点を克服する新たな方法の開発を試みた。IS6110の内側から外側に向けて配列した一対のプライマーを作成。IS6110の配列を持つ DNA 部分を *Sau 3 A I* を用いて分解し、PCR 法にて増幅し、結核菌株の染色体 DNA と結合させる方法を開発した。感染経路の独立した患者から分離した21株と8つの集団発生時分離した23株を用いて検定した結果、精度、感度とも RFLP 法と同等で、しかも結核菌の型鑑別に要する期間が1ヶ月から8時間に短縮できることが確認された。

結核患者の接触者調査や結核蔓延状況の解明などのスクリーニング検査法として極めて有用な方法と考えられ、この成果は学位に値するものと認める。